琥珀蚕线粒体全基因组测序及序列分析

钟 健, 刘增虎, 杨伟克, 朱 峰, 董占鹏*

(云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所, 云南蒙自 661101)

摘要:【目的】分析昆虫的线粒体基因组能很好地指示昆虫物种的亲缘关系。本研究旨在探索琥珀蚕 *Antheraea assama* 线粒体基因组并在线粒体水平上了解大蚕蛾科(Saturniidae)属及种间的分子系统进化关系。【方法】采用 PCR 步移法并结合克隆测序的策略,测定了珍稀绢丝昆虫琥珀蚕的线粒体基因组全序列,分析其结构特点和碱基组成;采用邻近距离法(NJ)构建大蚕蛾科及外群共 14 种昆虫线粒体蛋白质编码基因的系统发育树,并分析琥珀蚕在大蚕蛾科中的系统发育关系。【结果】琥珀蚕线粒体基因组序列全长 15 312 bp (GenBank 登录号: KU301792),包含 13 个蛋白质编码基因、22 个 tRNA 基因、2 个核糖体 rRNA 基因和一段 332 bp 的 A + T 富集区,呈现典型的鳞翅目昆虫线粒体基因组的核苷酸组成及基因排布顺序。分析结果表明,琥珀蚕线粒体基因组中 A + T 含量高达 80.18%,13 个蛋白质编码基因中,除了 *COX*1 以 CGA 为起始密码子,其他均为典型的起始密码子 ATN。*COX*1、*COX*2 和 *ND*5 均以不完整的 T 为终止密码子,其余基因都是以典型的 TAA 或 TAG 为终止密码子。预测的 22 个 tRNA 二级结构中,除 $tRNA^{Ser(AGN)}$ 缺乏 DHU 臂外,其他 21 个 tRNA 均能形成典型的三叶草结构。由线粒体蛋白质基因串联序列构建的 NJ 系统发育树表明,琥珀蚕与柞蚕 *Antheraea pernyi*、天蚕 *Antheraea yamamai*、明目大蚕 *Antheraea frithi* 构成鳞翅目大蚕蛾科柞蚕属 *Antheraea* 这一分支。在 9 种大蚕蛾科昆虫中,琥珀蚕与柞蚕属的天蚕亲缘关系最近,与巨大蚕蛾属 *Attacus* 的乌桕大蚕 *Attacus atlas* 亲缘关系较远。【结论】琥珀蚕线粒体基因组的基因排列方式同其他已测定的鳞翅目昆虫的完全相同。基于线粒体基因组的大蚕蛾科昆虫系统发育关系与传统的形态分类学结果一致,即琥珀蚕隶属于柞蚕属 *Antheraea*。

关键词: 大蚕蛾科; 柞蚕属; 琥珀蚕; 线粒体基因组; 系统发育

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2017)08-0936-14

Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Antheraea assama* (Lepidoptera: Saturniidae)

ZHONG Jian, LIU Zeng-Hu, YANG Wei-Ke, ZHU Feng, DONG Zhan-Peng* (Institute of Sericulture and Apiculture, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi, Yunnan 661101, China)

Abstract:【Aim】Analyzing the mitochondrial genomes of insects can well indicate the genetic relationship among insect species. This study aims to explore the mitochondrial genome of *Antheraea assama* and to understand the intergeneric and interspecific molecular and evolutionary relationships of Saturniidae based on the mitochondrial genome sequences.【Methods】The complete mitochondrial genome sequence of *Antheraea assama*, a rare silk-spinning insect, was determined by using PCR and primer walking, and its general features and base composition were analyzed. The phylogenetic tree of mitochondrial protein-coding genes of fourteen species of Saturniidae and the outgroup was constructed by using the neighbor-joining method (NJ), and the phylogenetic relationships of *A. assama* within Saturniidae were analyzed.【Results】The mitochondrial genome of *A. assama* (GenBank accession no.:

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(31360586); 云南省现代农业蚕桑产业技术体系建设项目(2013K-JTX006); 云南省优秀团队建设培育及科研超前预研基金项目(YAAS2014YY032); 中央茧丝绸发展专项

作者简介: 钟健, 男, 1978 年 12 月生, 四川内江人, 硕士, 副研究员, 研究方向为野蚕资源的调查利用 E-mail: autment@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: scsdong@163.com

收稿日期 Received: 2017-02-06; 接受日期 Accepted: 2017-07-13

KU301792) is 15 312 bp in length, and contains 13 protein-coding genes (PCGs), 22 tRNA genes, 2 ribosomal RNA genes and a 332 bp A + T-rich region. The sequenced genome displays the genomic components and gene order of the typical lepidopteran mitochondrial genome. The sequence analysis revealed that the mitochondrial genome of *A. assama* is biased toward a high A + T content (80.18%). All protein-coding genes start with a typical ATN initiation codon, except that *COX*1 starts with the CGA codon. Majority of the 13 PCGs have a complete termination codon (TAA or TAG), except that *COX*1, *COX*2 and *ND*5 genes terminates with the incomplete stop codon T. The secondary structure of 22 tRNA genes by predicting showed the classic clover-leaf structure, except that the dihydrouridine (DHU) arm of $tRNA^{Ser(AGN)}$ forms a simple loop. The NJ tree based on the mtDNA protein-coding gene sequences showed that *A. assama* formed the clade of *Antheraea* (Lepidoptera: Saturniidae) with *Antheraea pernyi*, *Antheraea yamamai* and *Antheraea frithi*. In nine species of Saturniidae studied, *A. assama* has the closest relationship with *A. yamamai* of *Antheraea*, and has a farther relationship with *Attacus atlas* of *Attacus*. 【Conclusion】 The gene arrangement pattern of the mitochondrial genome of *A. assama* is identical to those of other lepidopteran insects that have been assayed. The phylogenetic relationships of Saturniidae constructed based on the mitochondrial genomes are consistent with those in traditional morphological taxonomy, *i. e.*, *A. assama* belongs to *Antheraea*.

Key words: Saturniidae; *Antheraea*; *Antheraea assama*; mitochondrial genome; phylogeny

线粒体(mitochondrion)是真核生物细胞内的重要细胞器,能为细胞生命活动提供能量,处于新陈代谢和生物能量转换的中心地位。线粒体内含有自身独立的遗传物质——线粒体 DNA(mitochondria DNA, mtDNA)。动物线粒体 DNA 的长度一般在 15.4 ~16.3 kb(Woese *et al*., 1983),通常为结构高度紧凑的共价闭合环状分子,一般编码 37 个基因,其中包括 13 个蛋白质编码基因、22 个转运 RNA (tRNA)基因、2 个核糖体 RNA(rRNA)基因和 1 个非编码控制区(D-loop 区)。很多线粒体蛋白质编码基因含有不完整的 T 或 TA 终止密码子,通过转录后加工时补全终止密码子(Ojala *et al*., 1981)。动物线粒体 DNA 属于母性遗传,线粒体基因组的基因排列方式极为紧凑,编码效率高,部分基因间会发生相互重叠,在遗传过程中不发生基因重组、易位和倒位等突变。线粒体基因组具有比核基因组更高的突变率,因而 mtDNA 成为目前研究动物起源进化及群体遗传分化的理想对象(Vigilant *et al*., 1991; Navajas *et al*., 1996),已成为一种重要的分子标记手段,广泛用于包括鳞翅目昆虫在内的许多物种的分类鉴定、种间分子进化、群体遗传关系和系统发育进化关系等研究(Kim *et al*., 2011, 2012; Cameron, 2014)。

琥珀蚕 *Antheraea assama* Westwood 是一种珍稀的绢丝昆虫,琥珀蚕丝呈天然的金黄色,高贵华丽价值不菲,现只有印度能少量生产。作者自 2006 年开始云南野蚕资源的信息收集与考察工作(江秀均等, 2010; 钟健等, 2012),开展了琥珀蚕形态学鉴定和生物学特性研究等前期工作,并利用线粒体 *COX*1 基因比较了大蚕蛾科昆虫的亲缘关系(钟健等, 2013, 2014)。本研究以琥珀蚕为研究对象,对琥珀蚕线粒体基因组进行测定和相关近缘种的比较分析,期望研究结果能为大蚕蛾科绢丝昆虫系统分类学和比较基因组学研究提供分子生物学方面的基础信息。

1　材料与方法

1.1　供试材料

作者于 2009 年在云南文山地区收集到野生琥珀蚕成虫的卵,繁育继代保存至今。琥珀蚕幼虫在温度 23 ~27℃、相对湿度 85% ~95% 条件下,用樟科天竺桂 *Cinnamomum pedunculatum* 叶片饲养至结茧,取化蛹 7 d 的琥珀蚕蛹提取基因组。

1.2　琥珀蚕基因组 DNA 提取、引物设计及 PCR 扩增

取琥珀蚕蛹的头部和腹部,去除内部污物,采用常规的“平衡酚-氯仿-异戊醇”抽提法提取总 DNA,方法参照赵巧玲等(2000)。

从 NCBI 上下载已报道的柞蚕属及其他近缘种的线粒体基因组序列,进行 Clustal X 比对寻找保守区域,根据引物设计的基本原则,利用引物辅助设计软件 Primer Primier(Ver. 5.0)等设计相关引物 16 对(表 1),覆盖了琥珀蚕线粒体基因组的全部序列。

表 1 琥珀蚕线粒体基因组测序引物

Table 1 Primers for sequencing of the mitochondrial genome of *Antheraea assama*

扩增基因片段 Amplified gene fragment	引物序列(5′-3′) Primer sequences	片段大小(bp) Fragment size
F1	Assa1-F: TTTTGGGCTCATACCTCAAATAT Assa1-R: ACAATAGTATTATAAATTTGATCA	1 612
F2	Assa2-F: AGGAATAGTAGGAACTTCATT Assa2-R: TGGATGGCCAAAAAATCAAAATAAA	646
F3	Assa3-F: CTTCTTTCTTTGATCCTGCTGG Assa3-R: GAAATTCTTTCAATTACAATAGG	1 603
F4	Assa4-F: CAAACAAATTTTTTTATTAATCGA Assa4-R: GAAATAAAAATAAAAGTTGATCCTT	710
F5	Assa5-F: CTTCACAATGAATTTAAAACCTTAT Assa5-R: ACTTTTTGATTGGAAATCAAATAT	1 353
F6	Assa6-F: ATTTTGGATTTGAAGCTGCTGCTT Assa6-R: CCACTAAAAATTAAGTTAGCAGC	755
F7	Assa7-F: AAAGAGGTATATCACTGTTAA Assa7-R: GATATTCAAGATATTCGTTATATAGG	1 029
F8	Assa8-F: CCTATATAACGAATATCTTGAATATCAT Assa8-R: GTTTTAATTTCTTTTTTTAGAGCTGG	1 259
F9	Assa9-F: CATGTTGTGTAAAAGAAAATA Assa9-R: CCTATATATTTTGTTCATTTATG	628
F10	Assa10-F: TTGAACCAGAAACAGGAGCTTCTA Assa10-R: GATTTACAAGACCAATGTTTTTA	986
F11	Assa11-F: GAAACAAAAATTAAATTTCCAATA Assa11-R: TCCATTAATAATTTTAATAATTGG	803
F12	Assa12-F: GATAAATAATTTCAAACCTATTCGA Assa12-R: GAATTATTTTTAGTATAAATTAATAG	1 244
F13	Assa13-F: GCATTTGTTTTGAAAACTTAAGAAAG Assa13-R: AAATCTTACATGATCTGAGTTCA	1 239
F14	Assa14-F: AAAGATAGAAACCAACCTGGCT Assa14-R: CGGCAAAAATTTATATTCACTTG	599
F15	Assa15-F: GCAGATTAGACTTTAAATTATTCTC Assa15-R: TTGCCCGTCGCTTTCATATATAAAT	876
F16	Assa16-F: ACTTTCCAGTACCTCTACTTTGTT Assa16-R: ATCCTTTAATCAGGCACTTTATTC	1 188

PCR 反应体系为 25 μL: 10 × Buffer 3 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 1 μL, 10 μmol/L 的上下游引物各 1 μL, 模板 1 μL(20 ng/μL), TaKaRa Taq 1.25 U, ddH_2O 17.75 μL。扩增条件: 94℃预变性 5 min, 95℃变性 45 s, 50~65℃退火 50 s, 72℃延伸 50 s, 34 个循环, 72℃延伸 10 min。采用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测 PCR 产物, 扩增得到的 PCR 产物经过直接纯化或凝胶回收纯化后, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。所有片段均为双向测序, 未能测通的序列则采用克隆测序或重新设计引物再测序, 补全序列。

1.3 琥珀蚕线粒体基因组序列拼接及注释

将测序得到的琥珀蚕线粒体基因组各序列片段用 DNAStar 软件包进行拼接组装得到线粒体基因组全序列。通过 NCBI 数据库的 BLAST 工具(http://blast.ncbi.nlm.nih.Gov/Blast.cgi)鉴定基因组中的蛋白质编码基因和 rRNA 基因, 采用在线注释软件 DOGMA(http://dogma.ccbb.utexas.edu)确定各基因位置, 同时参考已测得的大蚕蛾科昆虫(Liu *et al*., 2008; 洪桂云等, 2010; 杨绍宇等, 2014)及下载的近缘种线粒体基因组的注释结果进行校正。

采用 tRNAscan-SE 1.21 程序(Lowe and Eddy, 1997)预测 tRNA 基因的二级结构并用 RNAVIZ 2.0 程序(De Rijk and De Wachter, 1997)导出结果, 部分无法预测到的 tRNA 基因通过参照近缘种已注释序列, 比对确定位置并手工绘制二级结构。线粒体

基因组结构图利用 MTviz 在线绘图软件(http://pacosy. informatik. uni-leipzig. de/mtviz/mtviz)在线生成。

1.4　琥珀蚕线粒体基因组密码子使用偏好性分析

利用软件 MEGA5.2 和 DNAMan V6 进行碱基含量、多态位点和相似度分析，包括 A + T 含量、AT 偏度(AT skew)和 GC 偏度(GC skew)，线粒体基因组碱基组成偏度计算公式：AT skew = (A − T)/(A + T)；GC skew = (G − C)/(G + C)(Perna and Kocher, 1995)。并计算同义密码子使用相对频率(relative synonymous condon usage, RSCU)，分析线粒体基因组基因的密码子使用模式。

1.5　琥珀蚕线粒体基因组系统发育分析

为研究蚕蛾总科昆虫的亲缘关系，参照王菊平等(2015)的方法，建立 NJ 树。研究中涉及到的大蚕蛾科昆虫 9 种，并选择了鳞翅目的家蚕 *Bombyx mori*、烟草天蛾 *Manduca sexta*、菜粉蝶 *Pieris rapae*、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 和双翅目的黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 作为外群，将 14 种昆虫线粒体基因组中的 13 个蛋白质编码基因序列串联后，基因的排列顺序未做改变，通过 Clustal X 1.83 软件进行序列比对，避免移码。基于 Kimura-2-Parameter (K2P)双参数模型(Kimura, 1980)计算序列间的变异度，采用邻近距离法(neighbor-joining method, NJ)(Saitou and Nei, 1987)构建系统进化树，完全删除空位。系统树分支的置信水平用自引导检验(Bootstrap test)(Felsenstein, 1985)估计，自展值重复抽样1 000次。

2　结果

2.1　琥珀蚕线粒体基因组的基因组成和分布特征

琥珀蚕的线粒体基因组全长 15 312 bp (GenBank 登录号：KU301792)。琥珀蚕线粒体基因组的基因排布顺序与典型的鳞翅目昆虫线粒体基因组的基因排布顺序完全一致，呈双链闭合环状结构，基因组成包含 13 个蛋白质编码基因(PCGs)、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因(12S rRNA 和 16S rRNA)和一个 A + T 富集区(CR 区)。线粒体 37 个基因中，有 23 个基因分布于 J 链(majority-strand):9 个蛋白质编码基因(*ND2*, *COX1*, *COX2*, *ATP8*, *ATP6*, *COX3*, *ND3*, *ND6* 和 *CYTB*)和 14 个 tRNA，14 个基因在 N 链(minority-strand)上编码:4 个蛋白编码基因(*ND5*, *ND4*, *ND4L* 和 *ND1*)、8 个 tRNA 基因及 2 个 rRNA 基因。A + T 富集区有 332 bp。琥珀蚕线粒体基因组基因结构及分布如图 1。

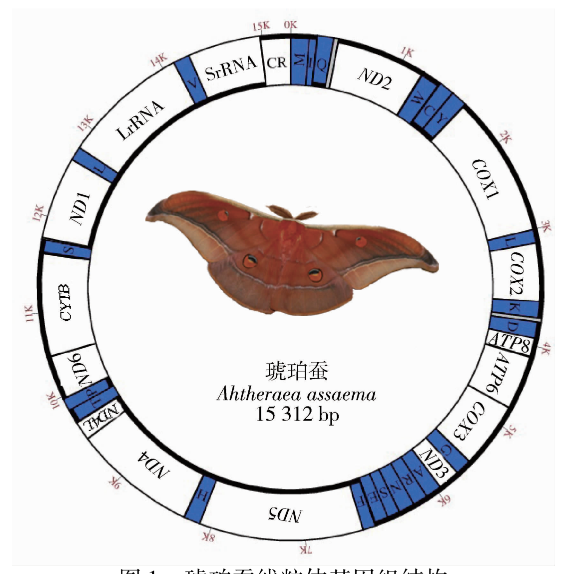


图 1　琥珀蚕线粒体基因组结构

Fig. 1　Gene map of the mitogenome of *Antheraea assama*

外圆粗线的基因表示在 J 链编码，内圆粗线的基因表示在 N 链编码；蓝色填充表示不同的 tRNA 基因，用对应的氨基酸单字母表示，未填充颜色的白色框分别表示蛋白质编码基因、rRNA 和控制区。The genes on the bold outer circles are located on the J-strand. The genes on the bold inner circles are located on the N-strand. The blue-filled blocks denote tRNA genes, which are indicated by one-letter amino acid code of the corresponding amino acid. The white blocks denote protein-coding genes, rRNA genes and the control region, respectively.

琥珀蚕线粒体基因组有 6 处基因重叠，共 21 bp，最长一处位于 $tRNA^{Trp}$ 和 $tRNA^{Cys}$ 之间，重叠序列为 8 bp；其次是 *ATP8* 和 *ATP6* 之间，重叠序列为 7 bp。基因间隔有 16 处，共 174 bp，$tRNA^{Gln}$ 和 *ND2* 之间间隔最长为 50 bp，其次是 $tRNA^{Lys}$ 和 $tRNA^{Asp}$ 之间，间隔 45 bp；$tRNA^{Ser}$(UCN)和 *ND1* 之间间隔 18 bp；既无间隔又无重复的区域有 16 处(表 2)。

2.2　琥珀蚕线粒体基因组核苷酸组成

琥珀蚕线粒体基因组中 A 碱基数目为 6 026，占 39.35%；T 碱基数目为 6 251，占 40.82%；G 碱基数目为 1 181，占 7.71%；C 碱基数目为 1 854，占 12.11%；T 碱基含量最高而 G 含量最低。A + T 碱基含量占 80.18%，G + C 占 19.82%，AT 偏度为 −0.0183，GC 偏度为 −0.146(表 3)，均为负值。从表 3 中还可以看出，蛋白质编码基因密码子第 1 位点的 A + T 含量(73.09%)高于第 2 位点(70.37%)，而第 3 位点 A + T 含量则高达 92.78%。这与天蚕(第 1, 2 和 3 位点 A + T 含量分别为 73.04%, 70.50% 和93.32%)及明目大蚕(第1, 2

表 2 琥珀蚕线粒体基因组的基因分布及注释

Table 2 Gene organization and annotation of the mitochondrial genome of *Antheraea assama*

基因 Gene	编码链 Coding strand	位置(nt) Position	长度(bp) Size	反密码子及位置(nt) Anticodon and position	基因间的间隔(bp) Intergenic length	起始密码子 Start codon	终止密码子 Stop codon
tRNA^{Met}	J	1 – 68	68	CAT 33 – 35	0		
tRNA^{Ile}	J	69 – 133	68	GAT 106 – 108	– 3		
tRNA^{Gln}	N	131 – 199	69	TTG 167 – 169	50		
*ND*2	J	250 – 1 263	1 014		7	ATT	TAA
tRNA^{Trp}	J	1 271 – 1 338	68	TCA 1 302 – 1 304	– 8		
tRNA^{Cys}	N	1 331 – 1 395	65	GCA 1 361 – 1 363	4		
tRNA^{Tyr}	N	1 400 – 1 466	67	GTA 1 431 – 1 433	6		
*COX*1	J	1 473 – 3 003	1 531		0	CGA	T
tRNA^{Leu}(UUR)	J	3 004 – 3 071	68	TAA 3 034 – 3 036	0		
*COX*2	J	3 072 – 3 753	682		0	ATG	T
tRNA^{Lys}	J	3 754 – 3 824	71	CTT 3 784 – 3 786	45		
tRNA^{Asp}	J	3 870 – 3 936	67	GTC 3 901 – 3 903	0		
*ATP*8	J	3 937 – 4 101	165		– 7	ATT	TAA
*ATP*6	J	4 095 – 4 772	678		– 1	ATG	TAA
*COX*3	J	4 772 – 5 560	789		2	ATG	TAA
tRNA^{Gly}	J	5 563 – 5 628	66	TCC 5 593 – 5 595	0		
*ND*3	J	5 629 – 5 982	354		– 1	ATT	TAA
tRNA^{Ala}	J	5 982 – 6 047	66	TGC 6 012 – 6 014	– 1		
tRNA^{Arg}	J	6 047 – 6 111	65	TCG 6 075 – 6 077	0		
tRNA^{Asn}	J	6 112 – 6 176	65	GTT 6 142 – 6 144	2		
tRNA$^{Ser(AGN)}$	J	6 179 – 6 244	66	GCT 6 204 – 6 206	0		
tRNA^{Glu}	J	6 245 – 6 311	67	TTC 6 275 – 6 277	11		
tRNA^{Phe}	N	6 323 – 6 388	66	GAA 6 355 – 6 357	0		
*ND*5	N	6 389 – 8 129	1 741		0	ATT	T
tRNA^{His}	N	8 130 – 8 194	65	GTG 8 162 – 8 164	4		
*ND*4	N	8 199 – 9 539	1 341		1	ATG	TAA
ND4L	N	9 541 – 9 831	291		7	ATG	TAG
tRNA^{Thr}	J	9 839 – 9 903	65	TGT 9 869 – 9 871	0		
tRNA^{Pro}	N	9 904 – 9 968	65	TGG 9 936 – 9 938	2		
*ND*6	J	9 971 – 10 507	537		2	ATA	TAA
CYTB	J	10 510 – 11 658	1 149		12	ATA	TAA
tRNA$^{Ser(UCN)}$	J	11 671 – 11 736	66	TGA 11 699 – 11 701	18		
*ND*1	N	11 755 – 12 693	939		1	ATG	TAA
tRNA$^{Leu(CUN)}$	N	12 695 – 12 762	68	TAG 12 730 – 12 732	0		
LrRNA	N	12 763 – 14 133	1 371		0		
tRNA^{Val}	N	14 134 – 14 201	68	TAC 14 169 – 14 171	0		
SrRNA	N	14 202 – 14 980	779		0		
A + T region		14 981 – 15 312	332		0		

ND：NADH 脱氢酶亚基基因 NADH dehydrogense subunit coding gene；*COX*：细胞色素 C 氧化酶亚基基因 Cytochrome oxidase subunit coding gene；*ATP*：ATP 合成酶亚基基因 ATPase subunit coding gene；*CYTB*：细胞色素 b 基因 Cytochrome b coding gene；LrRNA：核糖体大亚基 RNA 基因 Large ribosomal RNA；SrRNA：核糖体小亚基 RNA 基因 Small ribosomal RNA；J：重链 Majority strand，N：轻链 Minority strand. 在基因间的间隔一栏中，正数表示基因间隔碱基数，负数表示基因重叠碱基数。In the column of intergenic length, the positive number indicates interval base pairs between genes while the negative number indicates overlapping base pairs between genes.

表 3　琥珀蚕线粒体基因组核苷酸组成

Table 3　Nucleotide composition of the mitochondrial genome of *Antheraea assama*

基因序列 Gene sequence	大小(bp) Size	A (%)	T (%)	G (%)	C (%)	A+T (%)	G+C (%)	AT 偏度 AT skew	GC 偏度 GC skew
全基因组 mtDNA	15 312	39.35	40.82	7.71	12.11	80.18	19.82	-0.0183	-0.148
蛋白质编码基因 Protein-coding genes	11 211	38.85	39.94	8.44	12.77	78.79	21.21	-0.0139	-0.204
密码子第 1 位 1st codon site	3 739	35.78	37.31	16.53	10.38	73.09	26.91	-0.0210	0.229
密码子第 2 位 2nd codon site	3 736	22.04	48.33	13.00	16.56	70.37	29.55	-0.3740	-0.120
密码子第 3 位 3rd codon site	3 736	41.16	51.62	2.73	4.41	92.78	7.14	-0.1130	-0.236
tRNA 基因 tRNA genes	1 466	39.97	40.59	8.12	11.32	80.56	19.44	-0.0076	-0.165
LrRNA	1 371	41.36	42.82	4.96	10.87	84.17	15.83	-0.0173	-0.373
SrRNA	779	40.31	44.42	5. 01	10.27	84.72	15.28	-0.0485	-0.345
A+T 富集区 A+T-rich region	332	40.96	49.7	2.11	7.23	90.66	9.34	-0.0964	-0.548

LrRNA：核糖体大亚基 RNA 基因 Large ribosomal RNA；SrRNA：核糖体小亚基 RNA 基因 Small ribosomal RNA. 表 4 同 The same for Table 4.

和 3 位点 AT 偏度分别为 72.74%，70.28% 和 93.10%）的趋势相近，说明柞蚕属昆虫线粒体基因组密码子的第 3 位点更偏好于 AT 碱基。

琥珀蚕线粒体基因组中 A+T 含量很高，这与其他鳞翅目昆虫是一致的。琥珀蚕线粒体基因组中 A+T 含量与已知的几种近缘种相比处于居中水平，曲缘尾大蚕 *Actias artemis aliena*(78.62%) < 乌桕大蚕 *Attacus atlas*(79.30%) < 蓖麻蚕 *Samia cynthia ricini*(79.86%) < 柞蚕 *Antheraea pernyi* (80.16%) < 琥珀蚕 *A. assama* (80.18%) < 明目大蚕 *Antheraea frithi* (80.19%) < 天蚕 *Antheraea yamamai* (80.29%) < 合目大蚕 *Saturnia boisduvalii* (80.63%) < 樟蚕 *Eriogyna pyretorum* (80.82%)（表 4）。除乌桕大蚕 AT 偏度为正值(0.00388)外，大蚕蛾科昆虫线粒体基因组多数呈现明显的负 AT 偏度，范围 -0.0306(樟蚕)到 -0.0101(蓖麻蚕)。

2.3　琥珀蚕线粒体基因组蛋白质编码基因

琥珀蚕线粒体基因组蛋白质编码基因序列有 11 211 bp，占总基因组的 73.22%。A 碱基数目为 4 355，占 38.85%；T 碱基数目为 4 478，占 39.94%；G 碱基数目 946，占 8.44%；C 碱基数目为 1 432，占 12.77%。A+T 碱基含量占 78.79%，较整个线粒体基因组 A+T 含量要低 1.4%，G+C 占 21.21%，同样也是 T 碱基含量最高而 G 含量最低。AT 偏度为 -0.0139，GC 偏度为 -0.204。

琥珀蚕线粒体基因组 13 个蛋白质编码基因共编码 3 726 个密码子（不含终止密码子），编码最频繁的氨基酸是 Leu(14.57%)、Ile(12.10%)、Phe(10.63%) 和 Ser(8.37%)，类似于其他大蚕蛾科昆虫(Liu *et al*., 2008；杨绍宇等，2014)。相对同义密码子使用情况显示：琥珀蚕线粒体基因组对碱基 A 和 T 具有明显的偏向性，其中最常用的 5 个密码子是 UUA(Leu)，AUU(Ile)，UUU(Phe)，AUA(Met) 和 AAU(Asn)，密码子使用次数分别为 455，428，378，248 和 232，且每个密码子的第 1 位点、第 2 位点和第 3 位点碱基都是由 A 和 T 组成（表 5）。

蛋白质编码基因中 *ND5* 基因最长(1 741 bp)，编码 580 个氨基酸；*ATP8* 最短(165 bp)，编码 54 个氨基酸。*ND2*，*ATP8*，*ND3* 和 *ND5* 基因以 ATT 为起始密码子，*COX2*，*ATP6*，*COX3*，*ND4*，*ND1* 和 *ND4L* 基因以 ATG 为起始密码子，*CYTB* 和 *ND6* 则以 ATA 为起始密码子，属于典型的起始密码子 ATN（甲硫氨酸或异亮氨酸）。只有 *COX1* 以 CGA 为起始密码子。在终止密码子的使用上，大多数基因以标准的 TAA 或 TAG 结尾，只有 *COX1*，*COX2* 和 *ND5* 以不完整的 T 结尾。

琥珀蚕与天蚕、明目大蚕和柞蚕在起始密码子的使用比较中，只有 *ND3* 基因存在差异，天蚕的起始密码子为 ATA，其他均为 ATT。而从编码的氨基酸来看，实际上都是编码的甲硫氨酸，符合典型的起始密码子 ATN，因此并没有发生实质性的改变。*ND3*，*ND4*，*ND4L* 和 *ATP6* 基因终止密码子的使用存在差异，其他的基因起始和终止密码子的使用都相同（表 6）。

表 4 大蚕蛾科 9 种近缘种线粒体基因组的碱基组成

Table 4 Nucleotide composition of mitochondrial genome of nine closely related species of Saturniidae

物种 Species	mtDNA			蛋白质编码基因 A + T 含量(%) A + T contentin in PCGs		LrRNA		SrRNA		A + T 富集区 A + T-rich region		GenBank 登录号 GenBank accession no.
	大小(bp) Size	A + T (%)	AT 偏度 AT skew			大小(bp) Size	A + T (%)	大小(bp) Size	A + T (%)	大小(bp) Size	A + T (%)	
曲缘尾大蚕 *Actias artemis aliena*	15 243	78.62	-0.0132	11 220	76.91	1 363	83.13	777	84.3	328	91.77	KF927042
乌桕大蚕 *Attacus atlas*	15 282	79.30	0.00388	11 210	77.73	1 368	84.8	777	83.14	357	90.48	KF006326
蓖麻蚕 *Samia cynthia ricini*	15 420	79.86	-0.0101	9 538	78.77	1 376	84.16	786	83.84	353	90.93	JF961379
柞蚕 *Antheraea pernyi*	15 566	80.16	-0.0215	11 213	78.52	1 369	83.86	775	84.13	552	90.40	AY242996
琥珀蚕 *A. assama*	15 312	80.18	-0.0183	11 211	78.79	1 371	84.17	779	84.72	332	90.66	KU301792
明目大蚕 *A. frithi*	15 338	80.19	-0.0177	11 208	78.69	1 380	83.99	777	84.56	333	89.19	KJ740437
天蚕 *A. yamamai*	15 338	80.29	-0.0222	11 218	78.94	1 380	83.99	776	84.41	334	89.52	EU726630
合目大蚕 *Saturnia boisduvalii*	15 360	80.63	-0.0241	11 235	79.15	1 391	84.76	774	84.11	330	91.52	EF622227
樟蚕 *Eriogyna pyretorum*	15 327	80.82	-0.0306	11 226	79.41	1 338	84.6	778	84.45	358	92.18	FJ685653

表 5 琥珀蚕线粒体基因组密码子使用情况

Table 5 Codon usage in the mitochondrial genome of *Antheraea assama*

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	使用次数 n	RSCU	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	使用次数 n	RSCU
Phe (F)	UUU	378	1.91	Tyr (Y)	UAU	179	1.85
	UUC	18	0.09		UAC	14	0.15
Leu (L)	UUA	455	5.03	Stop codon *	UAA	12	1.85
	UUG	8	0.09		UAG	1	0.15
	CUU	47	0.52	His (H)	CAU	58	1.73
	CUC	6	0.07		CAC	9	0.27
	CUA	27	0.30	Gln (Q)	CAA	57	1.81
	CUG	0	0		CAG	6	0.19
Ile (I)	AUU	428	1.88	Asn (N)	AAU	232	1.89
	AUC	27	0.12		AAC	14	0.11
Met (M)	AUA	248	1.84	Lys (K)	AAA	93	1.74
	AUG	22	0.16		AAG	14	0.26
Val (V)	GUU	69	1.93	Asp (D)	GAU	58	1.78
	GUC	3	0.08		GAC	7	0.22
	GUA	67	1.87	Glu (E)	GAA	66	1.81
	GUG	4	0.11		GAG	7	0.19
Ser (S)	UCU	116	2.97	Cys (C)	UGU	26	1.68
	UCC	13	0.33		UGC	5	0.32
	UCA	75	1.92	Trp (W)	UGA	90	1.89
	UCG	0	0		UGG	5	0.11
Pro (P)	CCU	63	2.02	Arg (R)	CGU	19	1.43
	CCC	18	0.58		CGC	0	0
	CCA	43	1.38		CGA	32	2.42
	CCG	1	0.03		CGG	2	0.15
Thr (T)	ACU	91	2.39	Ser (AGN)	AGU	31	0.79
	ACC	13	0.34		AGC	4	0.10
	ACA	47	1.24		AGA	73	1.87
	ACG	1	0.03		AGG	0	0
Ala (A)	GCU	81	2.35	Gly (G)	GGU	54	1.09
	GCC	8	0.23		GGC	6	0.12
	GCA	48	1.39		GGA	109	2.19
	GCG	1	0.03		GGG	30	0.6

n：密码子使用次数 Frequency of a codon used；RSCU：同义密码子相对使用度 Relative synomymous codon usage. * 终止密码子 Stop codon.

2.4 琥珀蚕线粒体基因组 tRNA 和 rRNA 基因

琥珀蚕线粒体基因组包括 22 个 tRNA 基因，长度介于 65 ~ 71 bp 之间，在线粒体基因组的排列顺序与近缘种昆虫相同。根据在线软件 tRNAScan-SE 预测(成功预测了 19 种)，并辅助人工校正预测出琥珀蚕线粒体 22 个 tRNA 的二级结构，如图 2 所示。$tRNA^{Leu}$ 和 $tRNA^{Ser}$ 对应 2 种氨基酸，分别是 $tRNA^{Leu(UUR)}$、$tRNA^{Leu(CUN)}$ 和 $tRNA^{Ser(AGN)}$、$tRNA^{Ser(UCN)}$。22 个 tRNA 中，氨基酸受体臂长度均为 7 bp，反密码子臂中只有 $tRNA^{Leu(UUR)}$，$tRNA^{Lys}$ 和 $tRNA^{Gly}$ 的臂长为 4 bp，其余均为 5 bp。$tRNA^{Leu(UUR)}$ 的反密码子环为 9 bp，其余均为7 bp。TΨC 环碱基数目不定，3 ~

表 6 大蚕蛾科 9 种近缘种线粒体基因组蛋白编码基因起始密码子和终止密码子的使用情况

Table 6 Start and stop codon usages of mitochondrial protein-coding genes of nine closely related species of Saturniidae

基因 Gene	琥珀蚕 *Antheraea assama*	天蚕 *A. yamamai*	明目大蚕 *A. frithi*	柞蚕 *A. pernyi*	樟蚕 *Eriogyna pyretorum*	蓖麻蚕 *Samia cynthia ricini*	合目大蚕 *Saturnia boisduvalii*	曲缘尾大蚕 *Actias artemis aliena*	乌桕大蚕 *Attacus atlas*
	起始/终止密码子 Start/Stop codon	起始/终止密码子 Start/Stop codon	起始/终止密码子 Start/Stop codon	起始/终止密码子 Start/Stop codon	起始/终止密码子 Start/Stop codon	起始/终止密码子 Start/Stop codon	起始/终止密码子 Start/Stop codon	起始/终止密码子 Start/Stop codon	起始/终止密码子 Start/Stop codon
*ND*2	ATT/TAA	ATT/TAA	ATT/TAA	ATT/TAA	ATT/TAA	ATT/TAA	ATT/TAA	ATT/TAA	ATT/TAG
*COX*1	CGA/T	CGA/T	CGA/T	CGA/T	CGA/T	TTAG/T	CGA/TAA	CGA/T	CGA/T
*COX*2	ATG/T	ATG/T	ATG/T	ATG/T	GTG/T	ATG/uncerttained	GTG/T	ATG/T	ATG/T
*ATP*8	ATT/TAA	ATT/TAA	ATT/TAA	ATT/TAA	ATT/TAA	ATT/TAA	ATC/TAA	ATT/TAA	ATC/TAA
*ATP*6	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TA	ATG/TAA	ATG/TA	ATG/TA	ATG/TAA	ATG/TAA
*COX*3	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA
*ND*3	ATT/TAA	ATA/T	ATT/TAG	ATT/T	ATT/TAG	ATT/T	ATT/T	ATA/TAG	ATT/T
*ND*5	ATT/T	ATT/T	ATT/T	ATT/T	ATT/TAA	ATT/T	ATT/TAA	ATT/T	ATT/T
*ND*4	ATG/TAA	ATG/TAG	ATG/TAG	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA
ND4L	ATG/TAG	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/T	ATG/TAA	ATG/TAA
*ND*6	ATA/TAA	ATA/TAA	ATA/TAA	ATA/TAA	ATA/TAA	ATA/TAA	ATA/TAA	ATA/TAA	ATA/TAA
CYTB	ATA/TAA	ATA/TAA	ATA/TAA	ATA/TAA	ATG/TAA	ATA/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA	ATA/T
*ND*1	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/TAA	ATG/T	ATG/TAG	ATG/TAA	ATG/TAA

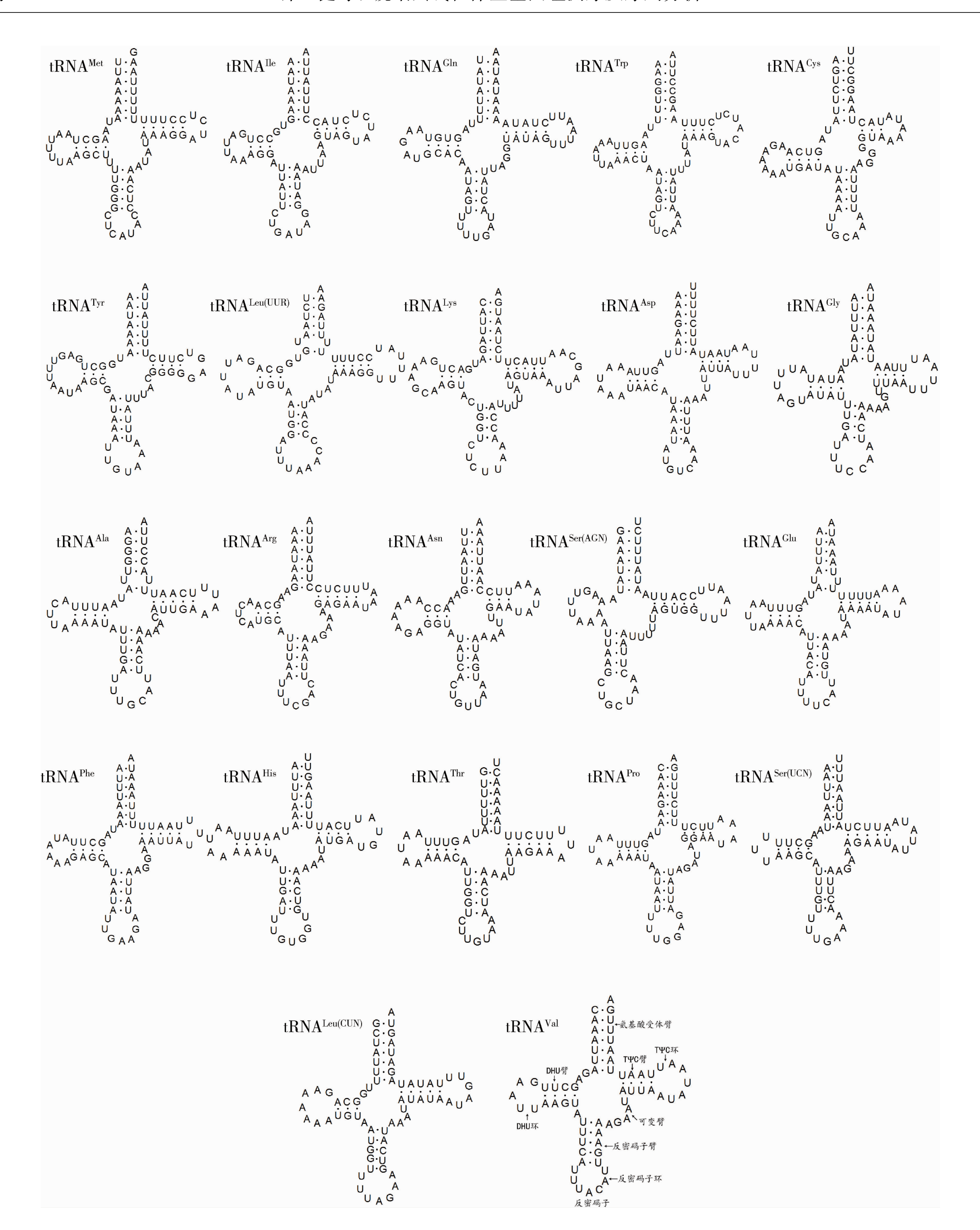


图 2　琥珀蚕线粒体基因组 tRNA 基因的二级结构

Fig. 2　Predicted secondary structure of tRNA genes in mitochondrial genome of *Antheraea assama*

8 bp 均有。同其他后生动物 tRNA 二级结构类似，22 个 tRNA 中，只有 tRNA$^{Ser(AGN)}$ 缺少 DHU 臂（Okimoto *et al.*, 1992），其他均可形成典型的三叶草结构。tRNA 在二级结构折叠过程中，会出现碱基错配情况，形成不标准的 G-U 碱基弱碱。在预测的 22 个 tRNA 二级结构中共出现 29 对碱基错配，其中 24 对为 G-U 错配，剩余 5 对为 U-U 错配，分别在 tRNA$^{Leu(UUR)}$，tRNA^{Ala}，tRNA^{Glu} 和 tRNA$^{Ser(UCN)}$ 中，这在其他昆虫类群 tRNA 二级结构中也较为常见（Bae *et al.*, 2004）。

线粒体基因组的 2 个 rRNA 基因（LrRNA 和 SrRNA）都是轻链编码，位于 tRNA$^{Leu(CUN)}$ 和控制区

之间，被 $tRNA^{Val}$ 基因隔开。LrRNA 长度 1 371 bp，A + T 含量为 84.17%，AT 偏度值为 0.0173；SrRNA 长度 779 bp，A + T 含量为 84.72%，AT 偏度值为 0.0485。

2.5　琥珀蚕线粒体基因组 A + T 富集区

A + T 富集区也称为控制区或 D-loop，是线粒体基因组的复制和转录主要调控区（Taanman，1999）。线粒体基因组的 A + T 富集区是线粒体的主要非编码区，位于 SrRNA 和 $tRNA^{Met}$ 基因之间，全长 332 bp，A + T 含量 90.66%，明显高于线粒体的其他基因（表 3）。控制区也存在鳞翅目昆虫典型的结构特征，在 SrRNA 基因下游 15 000 – 15 032 bp 处，有一段 ATAGA 引导长度为 19 bp 的多聚 T 结构，这种结构被认为是线粒体基因组轻链复制起始的信号识别位点（Saito *et al.*，2005）。在控制区没有发现明显的重复片段。与同属近缘种比较，明目大蚕 *A. frithi*（89.19%）< 天蚕 *A. yamamai*（89.52%）< 柞蚕 *A. pernyi*（90.40%）< 琥珀蚕 *A. assama*（90.66%）（表 4），琥珀蚕 A + T 富集区的 A + T 含量在柞蚕属也是最高的。

2.6　琥珀蚕的系统发育关系

以鳞翅目的家蚕 *B. mori*、烟草天蛾 *M. sexta*、菜粉蝶 *P. rapae* 和亚洲玉米螟 *O. furnacalis* 及双翅目的黑腹果蝇 *D. melanogaster* 作为外群，将 14 种昆虫线粒体全基因组中的 13 个蛋白质编码基因序列串联后构建 NJ 树。结果显示（图 3）大蚕蛾科中，琥珀蚕与天蚕、柞蚕、明目大蚕聚为一支，樟蚕和合目大蚕聚为一支，蓖麻蚕与乌桕大蚕聚为一支，曲缘尾大蚕蛾更靠近柞蚕属，符合形态分类学结果。琥珀蚕与天蚕、明目大蚕、柞蚕的遗传距离是 0.0862 ~ 0.0933（表 7），与天蚕的遗传距离最小。琥珀蚕与 9 种大蚕蛾科昆虫的遗传距离排列顺序是：天蚕 < 明目大蚕 < 柞蚕 < 樟蚕 < 蓖麻蚕 < 合目大蚕 < 曲缘尾大蚕 < 乌桕大蚕，因此，琥珀蚕与同为柞蚕属的天蚕亲缘关系最近，与巨大蚕蛾属的乌桕大蚕亲缘关系较远。

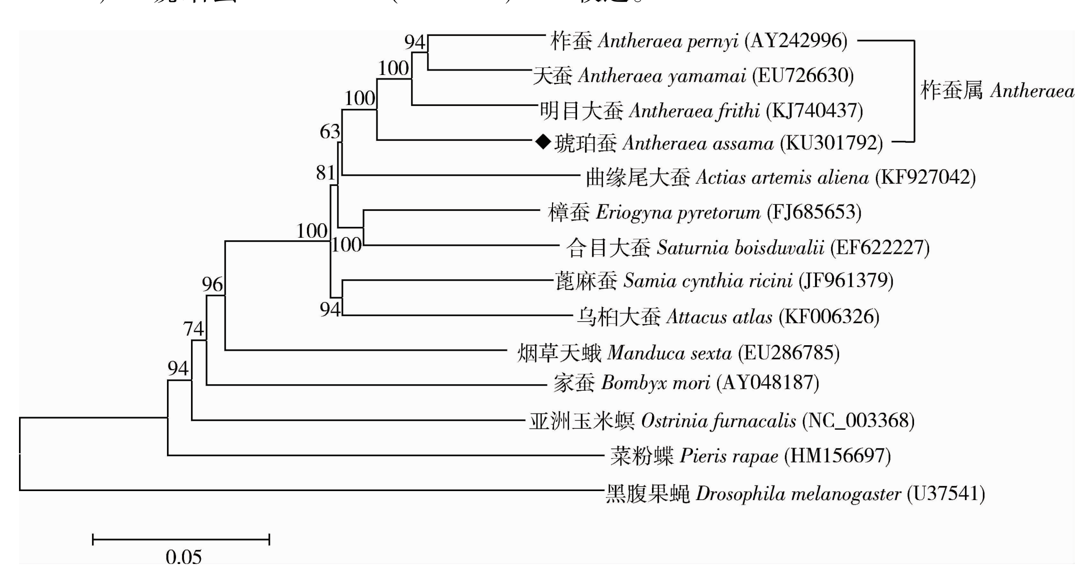


图 3　基于线粒体蛋白质编码基因序列构建的琥珀蚕与其他昆虫的系统进化树

Fig. 3　Phylogenetic tree of *Antheraea assama* and other insects based on the protein-coding gene sequences

利用邻接法，节点处数据为 1 000 个重复得到的自引导值。Neighbor-joining method was used, and the numbers on nodes indicate the bootstrap values from 1 000 replicates.

3　讨论

本研究首次获得了云南琥珀蚕线粒体基因组的完整序列，全长 15 312 bp，线粒体基因组 A + T 含量为 80.18%，与已知的柞蚕（Liu *et al.*，2008）、天蚕、明目大蚕等几种柞蚕属昆虫类似，在起始密码子的使用上也比较接近。琥珀蚕线粒体基因组的排列方式同其他已测定的鳞翅目昆虫的完全相同（鲁成等，2002；杨绍宇等，2014；王菊平等，2015），表明线粒体基因组的排列顺序很少发生变化，适合解决科、目等高阶元的生物系统发育关系（Boore，1999）。DNA 条形码技术常用的 *COX1*，*COX2*，*CYTB* 和 *ND5* 等线粒体基因在鳞翅目昆虫的快速识别、争议、物种的分类鉴定中发挥了较好的辅助作用（Hebert，2003；夏雪琴等，2016）。与 DNA 条形码

表 7　琥珀蚕与蚕蛾总科泌丝昆虫的线粒体蛋白质编码基因序列基于 K2P 参数的遗传距离

Table 7　The genetic distance of mitochondrial protein-coding gene sequences between *Antheraea assama* and other silk-producing insects of Bombycoidea based on K2P parameters

	琥珀蚕 *Antheraea assama*	天蚕 *A. yamamai*	明目大蚕 *A. frithi*	柞蚕 *A. pernyi*	樟蚕 *Eriogyna pyretorum*	蓖麻蚕 *Samia cynthia ricini*	合目大蚕 *Saturnia boisduvalii*	曲缘尾大蚕 *Actias artemis aliena*	乌桕大蚕 *Attacus atlas*	家蚕 *Bombyx mori*
琥珀蚕 *A. assama*										
天蚕 *A. yamamai*	0.0862									
明目大蚕 *A. frithi*	0.0913	0.0667								
柞蚕 *A. pernyi*	0.0933	0.0637	0.0780							
樟蚕 *E. pyretorum*	0.1112	0.1111	0.1099	0.1132						
蓖麻蚕 *S. cynthia ricini*	0.1179	0.1175	0.1189	0.1134	0.1255					
合目大蚕 *S. boisduvalii*	0.1179	0.1171	0.1193	0.1203	0.1050	0.1297				
曲缘尾大蚕 *A. artemis aliena*	0.1200	0.1216	0.1219	0.1284	0.1256	0.1320	0.1298			
乌桕大蚕 *A. atlas*	0.1271	0.1270	0.1312	0.1310	0.1244	0.1252	0.1333	0.1379		
家蚕 *B. mori*	0.1841	0.1883	0.1911	0.1878	0.1888	0.1881	0.1922	0.1947	0.1950	

技术比较,特别是在以高通量二代测序技术的快速发展支撑下,线粒体全基因组测序工作变得越来越快捷简便,费用大大降低,受到广大科研工作者的青睐。线粒体基因组在物种分类鉴定识别上更为全面和准确,避免了单个基因的盲目或某些物种的不适合造成的人为偏差,甚至在基因结构及排布顺序方面也能说明物种间的差异,具有更高的可信度。

本研究利用线粒体基因组 13 个蛋白质编码基因序列串联后聚类分析,结果表明琥珀蚕与天蚕、明目大蚕、柞蚕聚为一支,这与传统的形态分类结果一致,符合同为柞蚕属的判断。在 4 种柞蚕属昆虫中,柞蚕、天蚕、明目大蚕先聚为一支,再与琥珀蚕聚在一起,这表明柞蚕、天蚕、明目大蚕的亲缘关系较近,而琥珀蚕与三者的亲缘关系相对较远。这似乎可以从取食的饲料上看出一些迹象,虽然都是多食性昆虫,柞蚕、天蚕和明目大蚕都是主食壳斗科栎属 *Quercus* 植物,而琥珀蚕则主食樟科润楠属 *Machilus* 植物。从外群来看,大蚕蛾科昆虫首先与烟草天蛾聚在一起,再与家蚕和亚洲玉米螟相聚,符合传统上都是蛾类昆虫的判断;再与菜粉蝶聚在一起,符合同为鳞翅目的判断;最后才与双翅目的果蝇相聚。从构建的 NJ 系统发生分析表明,大蚕蛾科昆虫与烟草天蛾亲缘关系更近,与家蚕亲缘关系更远,这与传统分类方法得出的观点并不一致,二者系统聚类关系存在争议(Zwick *et al*., 2011),本研究结果支持前者。传统的分类方法根据昆虫翅脉的差异,认为蚕蛾总科(Bombycidae)包括蚕蛾科(Bombycidae)、箩纹蛾科(Brahmaeidae)、大蚕蛾科(Saturniidae)、角蠋蛾科(Citheroniidae)、桦蛾科(Endromidae)、枯叶蛾科(Lasiocampidae)、栎蛾科(Lacosomidae)和蚬蛾科(Lemoniidae)8 个科(朱弘复和王林瑶, 1996),而天蛾科未列其中。这样的划分是否全面,是否存在亲缘关系更近而未被划入的科均需要进一步研究。而线粒体基因组在这方面的鉴别优势明显,完全可以作为传统分类方法的补充和再验证。现阶段动物线粒体基因组的测序工作在飞速增长,但昆虫线粒体基因组的数据还明显偏少,蚕蛾总科的划分修正还需要更多的数据支持。

参考文献(References)

Bae JS, Kim I, Sohn HD, Jin BR, 2004. The mitochondrial genome of the firefly, *Pyrocoelia rufa*: complete DNA sequence, genome organization, and phylogenetic analysis with other insects. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32: 978 – 985.

Boore JL, 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 27(8): 1767 – 1780.

Cameron SL, 2014. Insect mitochondrial genomics: implications for evolution and phylogeny. *Annu. Rev. Entomol.*, 59(1): 95 – 117.

Chu HF, Wang LY, 1996. Fauna Sinica, Insecta, Vol. 5. Lepidoptera: Bombycidae, Saturniidae and Thyrididae. Science Press, Beijing. [朱弘复, 王林瑶, 1996. 中国动物志, 昆虫纲, 第 5 卷. 鳞翅目: 蚕蛾科, 大蚕蛾科, 网蛾科. 北京: 科学出版社]

De Rijk P, De Wachter R, 1997. RnaViz, a program for the visualisation of RNA secondary structure. *Nucleic Acids Res.*, 25(22): 4679 – 4684.

Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783 – 791.

Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.*, 270: 313 – 321.

Hong GY, Jiang ST, Yu M, Yang Y, Liu YQ, Wei ZJ, 2010. Cloning and sequencing analysis of the complete mitochondrial genome of *Eriogyna pyretorum*. *J. Nuclear Agric. Sci.*, 24(03): 495 – 501, 506. [洪桂云, 姜绍通, 于淼, 杨英, 刘彦群, 魏兆军, 2010. 绢丝昆虫樟蚕线粒体全基因组克隆及序列分析. 核农学报, 24(03): 495 – 501, 506]

Jiang XJ, Liu M, Chu YN, Liao PF, Zhong J, 2010. Preliminary report of the survey of wild Saturnidae silkmoth resources in Honghe, Yunnan. *China Sericult.*, 31(4): 28 – 31. [江秀均, 刘敏, 储一宁, 廖鹏飞, 钟健, 2010. 红河州野生大蚕蛾科绢丝昆虫资源调查初报. 中国蚕业, 31(4): 28 – 31]

Kim JS, Park JS, Kim MJ, Kang PD, Kim SG, Jin BR, Han YS, Kim I, 2012. Complete nucleotide sequence and organization of the mitochondrial genome of eri-silkworm, *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae). *J. Asia-Pac. Entomol.*, 15: 162 – 173.

Kim MJ, Kang AR, Jeong HC, Kim KG, Kim I, 2011. Reconstructing intraordinal relationships in Lepidoptera using mitochondrial genome data with the description of two newly sequenced lycaenids, *Spindasis takanonis* and *Protantigius superans* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 61: 436 – 445.

Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16(2): 111 – 120.

Liu YQ, Li YP, Pan MH, Dai FY, Zhu XW, Lu C, Xiang ZH, 2008. The complete mitochondrial genome of the Chinese oak silkmoth, *A. pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae). *Acta Bioch. Bioph. Sin.*, 40(8): 693 – 703.

Lowe TM, Eddy SR, 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.*, 25(5): 955 – 964.

Lu C, Liu YQ, Liao SY, Li B, Xiang ZH, Han HZ, Wang XG, 2002. Complete sequence determination and analysis of *Bombyx mori* mitochondrial genome. *J. Agric. Biotechnol.*, 10(2): 163 – 170. [鲁成, 刘运强, 廖顺尧, 李斌, 向仲怀, 韩华, 王学刚, 2002. 家蚕线粒体基因组全序列测定与分析. 农业生物技术学报, 10

(2)：163 –170]

Navajas M, Gutierrez J, Lagnel J, 1996. Mitochondrial cytochrome oxidase I in tetranychid mites: a comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits. *Bull. Entomol. Res.*, 86: 407 –417.

Ojala D, Montoya J, Attardi G, 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, 290 (5806): 470 – 474.

Okimoto R, Macfarlane J, Clary D, Wolstenholme DR, 1992. The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Genetics*, 130(3): 471 –498.

Perna NT, Kocher TD, 1995. Patterns of nucleotide composition at fourfold degenerate sites of animal mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.*, 41(3): 353 –358.

Saito S, Tamura K, Aotsuka T, 2005. Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics*, 171(4): 1695 –1705.

Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4): 406 – 425.

Taanman JW, 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta*, 1410(2): 103 –123.

Vigilant L, Stoneking M, Harpending H, Hawkes K, Wilson AC, 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*, 253(5027): 1503 –1507.

Wang JP, Xuan SB, Zhang YP, Yang J, Cao TW, Ma EB, 2015. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Chitoria ulupi* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Acta Entomol. Sin.*, 58(3): 319 –328. [王菊平, 宣善滨, 张育平, 杨静, 曹天文, 马恩波, 2015. 武铠蛱蝶线粒体基因组全序列测定和分析. 昆虫学报, 58(3): 319 –328]

Woese CR, Gutell R, Gupta R, Noller HF, 1983. Detailed analysis of the higher order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.*, 47(4): 621 –669.

Xia XQ, Chen X, Xia CC, Shi QH, Hao JS, 2016. Phylogenetic relationship within and between three major subfamilies of the Chinese lycaenids (Lepidoptera: Lycaenidae) based on mitochondrial *COI* and *Cytb* gene sequences. *Acta Entomol. Sin.*, 59 (1): 77 – 84. [夏雪琴, 陈晓, 夏琛琛, 石庆会, 郝家胜, 2016. 基于线粒体 *COI* 和 *Cytb* 基因的中国灰蝶三亚科主要类群间的系统发育关系分析. 昆虫学报, 59(1): 77 –84]

Yang SY, Sun W, Shen YH, Chen YP, Zhang Z, 2014. Complete sequencing, sequence structural features and phylogenetic analysis of *Philosamia cynthia ricini* mitochondrial genome. *Sci. Sericult.*, 40 (3): 429 – 439. [杨绍宇, 孙伟, 沈以红, 陈艳萍, 张泽, 2014. 蓖麻蚕线粒体全基因组测序及序列结构特征与系统进化分析. 蚕业科学, 40(3): 429 –439]

Zhao QL, Zhang ZF, He JL, 2000. A rapid method for preparing genomic DNA from pupae, *Bombyx mori*. *Sci. Sericult.*, 26 (1): 63 –64. [赵巧玲, 张志芳, 何家禄, 2000. 家蚕蛹体基因 DNA 的快速制备方法. 蚕业科学, 26(1): 63 –64]

Zhong J, Dong ZP, Jiang XJ, Li T, Yao LP, Liu M, Du W, Huang P, 2013. Bionomics of *A. assamensis*. *J. Appl. Entomol.*, 50 (3): 800 –806. [钟健, 董占鹏, 江秀均, 李涛, 姚丽萍, 刘敏, 杜伟, 黄平, 2013. 琥珀蚕的生物学特性. 应用昆虫学报, 50(3): 800 –806]

Zhong J, Jiang XJ, Cheng AL, Tang FF, 2014. Gene cloning and phylogenetic analysis of mitochondrial DNA CO Ⅰ sequence of *Antheraea assama* collected in Yunnan Province. *Sci. Sericult.*, 40 (4): 627 –632. [钟健, 江秀均, 陈安利, 唐芬芳, 2014. 云南省区收集琥珀蚕的 mtDNA CO Ⅰ 基因克隆和系统进化分析. 蚕业科学, 40(4): 627 –632]

Zhong J, Jiang XJ, Yao LP, Zhu SF, Liao PF, 2012. The breeding technology of Indian muga silkworms. *China Seric.*, 33 (4): 18 – 21. [钟健, 江秀均, 姚丽萍, 朱水芬, 廖鹏飞, 2012. 印度琥珀蚕养殖技术. 中国蚕业, 33(4): 18 –21]

Zwick A, Regier JC, Mitter C, Mitter C, Cummings MP, 2011. Increased gene sampling yields robust support for higher-level clades within Bombycoidea (Lepidoptera). *Syst. Entomol.*, 36(1): 31 – 43.

（责任编辑：马丽萍）